

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **09124510 A**

(43) Date of publication of application: **13.05.97**

(51) Int. Cl

A61K 45/00
A61K 31/195
A61K 31/38
A61K 38/00
C07C239/08
C07C311/29
C07D333/34
C07K 14/705
C12N 9/99
C12P 21/08
G01N 33/566

(21) Application number: **07303493**

(22) Date of filing: **27.10.95**

(71) Applicant: **SUMITOMO ELECTRIC IND LTD**

(72) Inventor: **KAYAGAKI NOBUHIKO**
KAWASAKI AKIYOSHI
YAKIDA HIDEO
OKUMURA YASUSHI
NAKADA MOTOMI

(54) LIBERATION INHIBITOR OF FAS LIGAND AND INHIBITION

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a liberation inhibitor and a method for suppressing liberation so as to suppress the liberation of the Fas ligand as a soluble Fas ligand from the cell surface of a Fas ligand manifesting cell and to efficiently detect a Fas ligand on the surface of a cell by using an antibody.

SOLUTION: The characteristic of this liberation inhibitor of a Fas ligand is that the inhibitor comprises an inhibitor for suppressing the activity of a protease capable of converting an Fas ligand on the cell surface into a soluble ligand as an active ingredient. A method for suppressing liberation of the Fas ligand is provided. This method detects the Fas ligand on the cell surface of the a Fas ligand manifesting cell by using an antibody against the

Fas ligand. The cell is treated with an inhibitor to suppress the activity of the protease capable of converting an Fas ligand on the cell surface into a soluble ligand as an active ingredient. The Fas ligand is detected by using an antigen against the Fas ligand.

COPYRIGHT: (C)1997,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-124510

(43) 公開日 平成9年(1997)5月13日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 45/00			A 6 1 K 45/00	
31/195	ADS		31/195	ADS
31/38	AED		31/38	AED
38/00		9547-4H	C 0 7 C 239/08	
C 0 7 C 239/08		7419-4H	311/29	
審査請求 未請求 請求項の数10 F D (全 9 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平7-303493

(22) 出願日 平成7年(1995)10月27日

(71) 出願人 000002130

住友電気工業株式会社

大阪府大阪市中央区北浜四丁目5番33号

(72) 発明者 樫垣 伸彦

東京都文京区本郷2-1-1 順天堂大学
医学部免疫学講座内

(72) 発明者 川崎 明美

東京都文京区本郷2-1-1 順天堂大学
医学部免疫学講座内

(72) 発明者 八木田 秀雄

東京都文京区本郷2-1-1 順天堂大学
医学部免疫学講座内

(74) 代理人 弁理士 西川 繁明

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 F a s リガンドの遊離抑制剤及び抑制方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 F a s リガンド発現細胞の細胞表面から F a s リガンドが可溶性 F a s リガンドとして遊離するのを抑制するための遊離抑制剤及び遊離抑制方法を提供すること。又細胞表面の F a s リガンドを抗体を用いて効率よく検出する方法を提供すること。

【解決手段】 細胞表面の F a s リガンドを可溶性 F a s リガンドに変換するタンパク質分解酵素の活性を阻害するインヒビターを有効成分とすることを特徴とする F a s リガンドの遊離抑制剤及び F a s リガンドの遊離抑制方又 F a s リガンド発現細胞の細胞表面の F a s リガンドを F a s リガンドに対する抗体を用いて検出する方法であって、該細胞に、細胞表面の F a s リガンドを可溶性 F a s リガンドに変換するタンパク質分解酵素の活性を阻害するインヒビターを作用させてから、 F a s リガンドに対する抗体を用いて検出する細胞表面の F a s リガンドの検出方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 Fasリガンド発現細胞またはFasリガンド遺伝子導入細胞の細胞表面からFasリガンドが可溶性Fasリガンドとして遊離するのを抑制するための遊離抑制剤であって、細胞表面のFasリガンドを可溶性Fasリガンドに変換するタンパク質分解酵素の活性を阻害するインヒビターを有効成分とすることを特徴とするFasリガンドの遊離抑制剤。

【請求項2】 細胞表面のFasリガンドを可溶性Fasリガンドに変換するタンパク質分解酵素の活性を阻害するインヒビターが、マトリクスメタロプロテアーゼのインヒビターである請求項1記載の遊離抑制剤。

【請求項3】 マトリクスメタロプロテアーゼのインヒビターが、細胞表面にあるMMP-1、MMP-2、またはMMP-3の活性を阻害するインヒビターである請求項2記載の遊離抑制剤。

【請求項4】 マトリクスメタロプロテアーゼのインヒビターが、ヒドロキサン酸系の物質である請求項2または3記載の遊離抑制剤。

【請求項5】 マトリクスメタロプロテアーゼのインヒビターが、[4-(N-ヒドロキシアミノ)-2R-イソブチル-3S-(2-チエニルチオメチル)スクシニル]-L-フェニルアラニン-N-メチルアミド(BB94)、[4-(N-ヒドロキシアミノ)-2R-イソブチル-3S-メチルスクシニル]-L-3-(5,6,7,8-テトラヒドロ-1-ナフチル)アラニン-N-メチルアミド(KB8301)、または[4-(N-ヒドロキシアミノ)-2R-フェニルプロピルスクシニル]-L-3-シクロヘキシルアラニン-N-[2-(4-スルホナミドフェニル)エチル]アミド(KB8112)である請求項4記載の遊離抑制剤。

【請求項6】 Fasリガンド発現細胞またはFasリガンド遺伝子導入細胞の細胞表面からFasリガンドが可溶性Fasリガンドとして遊離するのを抑制する方法であって、該細胞に、細胞表面のFasリガンドを可溶性Fasリガンドに変換するタンパク質分解酵素の活性を阻害するインヒビターを作用させることを特徴とするFasリガンドの遊離抑制方法。

【請求項7】 細胞表面のFasリガンドを可溶性Fasリガンドに変換するタンパク質分解酵素の活性を阻害するインヒビターとして、マトリクスメタロプロテアーゼのインヒビターを使用する請求項6記載の遊離抑制方法。

【請求項8】 Fasリガンド発現細胞またはFasリガンド遺伝子導入細胞の細胞表面のFasリガンドをFasリガンドに対する抗体を用いて検出する方法であって、該細胞に、細胞表面のFasリガンドを可溶性Fasリガンドに変換するタンパク質分解酵素の活性を阻害するインヒビターを作用させてから、Fasリガンドに対する抗体を用いて検出することを特徴とする細胞表面

のFasリガンドの検出方法。

【請求項9】 細胞表面のFasリガンドを可溶性Fasリガンドに変換するタンパク質分解酵素の活性を阻害するインヒビターとして、マトリクスメタロプロテアーゼのインヒビターを使用する請求項8記載の検出方法。

【請求項10】 Fasリガンドに対する抗体が、Fasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体である請求項8記載の検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、Fasリガンド発現細胞またはFasリガンド遺伝子導入細胞の細胞表面からFasリガンドが可溶性Fasリガンドとして遊離するのを抑制するための遊離抑制剤、及び遊離抑制方法に関する。また、本発明は、細胞表面のFasリガンドの効果的な検出方法に関する。本発明は、各種細胞のFasリガンドの発現解析、各種疾患の診断、治療等に有用である。

【0002】

【従来の技術】多細胞生物は、その恒常性を保つため、細胞の増殖と死を巧妙にコントロールしている。個体発生過程では、多くの細胞が細胞死によって除去される。成体においても、臓器を構成する細胞は、常に増殖と死のバランスを保ちながら、その機能を維持している。このような細胞死は、予め予定された死であり、プログラム細胞死(programmed cell death)とよばれている。これに対して、物理的または化学的要因によって引き起こされる死は、不慮の死(accidental cell death)とよばれ、プログラム細胞死と区別されている。

【0003】これら2つの死は、その過程が異なっている。プログラム細胞死では、細胞容積の縮小、核網状構造の消失と凝縮、細胞表面の微絨毛の消失及び水泡形成、そして、それらに続くアポトーシス小体(apoptotic body)の形成などの形態学的な特徴によって定義されるアポトーシスの過程を経て細胞が死ぬと考えられている。アポトーシスでは、殆どの場合、染色体DNAの断片化反応を伴う。これに対して、不慮の死では、細胞や核が膨潤し、破壊するネクロシスの過程を経て死ぬと考えられている。ところが、抗癌剤や放射線による細胞死、ウイルス感染による細胞死、あるいは細胞障害性リンパ細胞による標的細胞の死などは、決してプログラム細胞死であるとは考えられないにもかかわらず、アポトーシスの過程を経ることが分かっていた。このことから、現在では、アポトーシスとプログラム細胞死は、必ずしも同一ではないと考えられるに至り、両者は、区別されるようになってきている。

【0004】アポトーシスを誘導する要因または物質として、現在、多くのものが知られている。Fas(Fas抗原)は、アポトーシスを媒介する細胞表面タンパク

10

20

30

40

50

質として知られている。Fasは、細胞に死のシグナルを伝える細胞表面タンパク質として単離されたもので、TNF/NGF受容体ファミリーに属する分子量45KdaのI型細胞膜貫通型タンパク質である。TNF/NGF受容体ファミリーのメンバーは、その殆どがそれぞれ特異的なリガンドに対する受容体であると考えられている。Fasも、アポトーシスのシグナルを媒介するリガンドに対する受容体と考えられている。Fasを発現している細胞は、FasがそのリガンドであるFasリガンドと結合することにより、アポトーシスのスイッチが入り、死にいたる。Fasリガンドは、Fasの生理的リガンドであり、分子量40Kdaの細胞表面タンパク質である。Fasリガンドは、その構造から、TNFファミリーであることが分かっている。Fasリガンドは、Fasを発現している細胞にアポトーシスを誘導する活性を有している。

【0005】FasとFasリガンドの系(すなわち、Fasシステム)は、アポトーシスに関して、現在までに最も研究が進展している分野であり、多くの研究報告がなされている。例えば、Fasがアポトーシスのスイッチの役割を果たすことは、米原らの抗Fas抗体の作製に関する論文(J. Exp. Med., vol. 169, p. 1747-1756, 1989年)にまでさかのぼることができる。その後、Fas遺伝子のクローニングにより、Fasの構造が明らかにされている(Cell vol. 66, p. 233-243, 1991年)。さらに、エイズ原因ウイルスHIV感染T細胞に、Fasが発現していること(Proc. Natl. Acad. Sci., USA, vol. 87, p. 9620-9624, 1990年)、抗Fas抗体(Jo-2抗体)をマウスに投与すれば、マウスは激症肝炎に似た現象を起こして死ぬこと(Nature vol. 364, P806-809, 1993年)等が報告されている。この他にも種々の研究報告がなされ、これらについては実験医学vol. 11, No. 17, 1993年の「アポトーシス—細胞死の構造—」羊土社版、及び実験医学vol. 13, No. 16, 1995年の「アポトーシス研究の最前線—シグナル伝達構造から疾患まで」羊土社版に詳しくまとめられている。

【0006】このように、Fasリガンド(FasL)は、アポトーシスを媒介する細胞表面タンパク質であるFas抗原のリガンドである。Fasリガンドは、その遺伝子の同定結果によれば、278個のアミノ酸からなる分子量31,138の蛋白質であることが判明している。現在までにヒト、ラット、及びマウスのFasリガンドが同定されている。Fasリガンドの発現細胞は、活性化リンパ球等のFas発現細胞をアポトーシスによって除去することによって、免疫反応の制御に重要な役割を果たしていると考えられる。

【0007】ところで、本発明者らは、生体内でのFas

sリガンドの機能を詳細に解析するために、Fasリガンドと特異的に反応し、しかもFasとFasリガンドとの結合を阻害することができるモノクローナル抗体の研究開発を行ったが、この抗体の開発の過程で興味深い現象を見出した。すなわち、ヒトのFasリガンドの遺伝子を細胞に導入し、遺伝子導入細胞を培養したところ、培養液中に可溶性タイプのFasリガンドが存在することがわかった。本発明者らが開発したFasリガンドに対するモノクローナル抗体は、細胞表面のFasリガンドだけではなく、分泌した可溶性Fasリガンドとも反応することができる。したがって、可溶性Fasリガンドの存在は、FasとFasリガンドとの結合を阻害する抗体や該抗体を有効成分とする薬剤の開発等には、支障を生じることはなかった。

【0008】しかしながら、どの細胞がFasリガンドを発現しているのかを、例えば、細胞を染色する方法である組織染色法、あるいは1個1個の細胞を水流にのせて流し、これにレーザー光束を当てることにより細胞の性質を主として光学的なパラメーターとして測定するフローサイトメーター法などで調べるのには、可溶性Fasリガンドの存在は不都合であった。本発明者らの研究によれば、細胞表面にとどまるFasリガンドの量は少なく、かなりの量のものが可溶性Fasリガンドとして遊離していることが、開発したFasリガンドに対するモノクローナル抗体を用いた検討により明らかとなった。このような可溶性Fasリガンドの存在は、Fasリガンド発現細胞の同定を困難にするだけではなく、生体内においては、Fas発現細胞や組織が、血液中や体液中に分泌してくる可溶性Fasリガンドの作用を受けて、アポトーシスが誘導されて死んでしまうという問題を生じる。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、Fasリガンド発現細胞またはFasリガンド遺伝子導入細胞の細胞表面からFasリガンドが可溶性Fasリガンドとして遊離するのを抑制するための遊離抑制剤、及び遊離抑制方法を提供することにある。また、本発明の目的は、細胞表面のFasリガンドをFasリガンドに対する抗体を用いて効率よく検出する方法を提供することにある。本発明者らは、Fasリガンドは、TNFファミリーに属するII型の膜貫通タンパク質である点に着目した。従来より、TNFファミリーに属するII型の膜貫通タンパク質は、マトリクスメタロプロテアーゼなどのタンパク質分解酵素により切断されることが知られている。そこで、細胞表面のFasリガンドが可溶性Fasリガンドとして分泌する原因は、Fasリガンドがタンパク質分解酵素の作用を受けて、切断されるためではないかということに想到した。

【0010】そこで、種々のプロテアーゼインヒビターを添加してヒトFasリガンド遺伝子導入細胞を培養

10

20

30

40

50

し、Fasリガンドに対するモノクローナル抗体を用いたフローサイトメトリー解析を行った。その結果、マトリクスメタロプロテアーゼインヒビターなどの細胞表面のFasリガンドを可溶性Fasリガンドに変換するタンパク質分解酵素の活性を阻害するインヒビターを作用させることにより、Fasリガンドの遊離を抑制できることを見出した。また、この方法により、Fasリガンドの遊離を抑制すれば、細胞表面のFasリガンドを効率良く測定できることを見出した。本発明は、これらの知見に基づいて完成するに至ったものである。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明によれば、Fasリガンド発現細胞またはFasリガンド遺伝子導入細胞の細胞表面からFasリガンドが可溶性Fasリガンドとして遊離するのを抑制するための遊離抑制剤であって、細胞表面のFasリガンドを可溶性Fasリガンドに変換するタンパク質分解酵素の活性を阻害するインヒビターを有効成分とすることを特徴とするFasリガンドの遊離抑制剤が提供される。また、本発明によれば、Fasリガンド発現細胞またはFasリガンド遺伝子導入細胞の細胞表面からFasリガンドが可溶性Fasリガンドとして遊離するのを抑制する方法であって、該細胞に、細胞表面のFasリガンドを可溶性Fasリガンドに変換するタンパク質分解酵素の活性を阻害するインヒビターを作用させることを特徴とするFasリガンドの遊離抑制方法が提供される。

【0012】さらに、本発明によれば、Fasリガンド発現細胞またはFasリガンド遺伝子導入細胞の細胞表面のFasリガンドをFasリガンドに対する抗体を用いて検出する方法であって、該細胞に、細胞表面のFasリガンドを可溶性Fasリガンドに変換するタンパク質分解酵素の活性を阻害するインヒビターを作用させることから、Fasリガンドに対する抗体を用いて検出することとを特徴とする細胞表面のFasリガンドの検出方法が提供される。細胞表面のFasリガンドを可溶性Fasリガンドに変換するタンパク質分解酵素の活性を阻害するインヒビターとしては、マトリクスメタロプロテアーゼのインヒビターが特に効果的である。

【0013】

【発明の実施の形態】本発明では、細胞表面のFasリガンドを可溶性Fasリガンドに変換するタンパク質分解酵素の活性を阻害するインヒビター、好ましくはマトリクスメタロプロテアーゼ(matrix metalloproteinase; MMP)のインヒビターを作用させることにより、Fasリガンド遺伝子導入細胞並びにFasリガンド発現細胞から可溶性Fasリガンドが遊離することを抑制する。したがって、本発明を用いれば、多くのことがわかる。

【0014】第一に、Fasリガンドを発現している細胞を同定することができる。本発明の検出方法によれ

ば、後述するヒト末梢血リンパ球のFasリガンドの発現をフローサイトメーターで調べることができ、重要なデータを得ることができる。第二に、溶液中にFasリガンドが出てこないということは、生体内においては、血液中あるいは体液中に出てこないということである。Fasリガンドが遊離して血液中や体液中にもれてくると、Fasを発現している細胞や組織のすべてがアポトーシスにより死んでしまう可能性がある。外部からの抗原(ウィルス、細菌など)の侵入あるいは内部からの抗原(癌、異常細胞など)の刺激により、T細胞が活性化してFasリガンドを発現し、これらの抗原(Fas抗原)を持つ細胞を除去する際、Fasリガンドが可溶性タイプになると、正常な細胞や組織ではあるが、Fasを発現しているために、可溶性Fasリガンドの攻撃にさらされるという問題がある。本発明の方法によれば、可溶性Fasリガンドによる正常な細胞や組織に及ぼす悪影響を考えずにすむメリットがある。

【0015】すなわち、Fasリガンドの遊離の抑制により、FasリガンドとFasとの反応は、すべて細胞間接触によるものとなり、局所での作用にとどまる。こうすれば、Fasを発現しているが正常である組織に関しては、害をうけないですむというメリットがある。本発明で使用するインヒビターとしては、マトリクスメタロプロテアーゼのインヒビターが特に効果的である。Fasリガンドの切断による可溶性化に関するマトリクスメタロプロテアーゼとしては、例えば、細胞表面にあるMMP-1、MMP-2、及びMMP-3などが挙げられる。したがって、インヒビターとしては、細胞表面にあるMMP-1、MMP-2、またはMMP-3の活性を阻害するインヒビターが好ましい。

【0016】また、マトリクスメタロプロテアーゼのインヒビターとして、ヒドロキサン酸系の物質は、特に効果的である。このようなマトリクスメタロプロテアーゼのインヒビターとしては、例えば、[4-(N-ヒドロキシアミノ)-2R-イソブチル-3S-(2-チエニルチオメチル)スクシニル]-L-フェニルアラニン-N-メチルアミド(BB94)、[4-(N-ヒドロキシアミノ)-2R-イソブチル-3S-メチルスクシニル]-L-3-(5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-1-ナフチル)アラニン-N-メチルアミド(KB8301)、または[4-(N-ヒドロキシアミノ)-2R-フェニルプロピルスクシニル]-L-3-シクロヘキシルアラニン-N-[2-(4-スルホナミドフェニル)エチル]アミド(KB8112)などを挙げるができる。Fasリガンド発現細胞またはFasリガンド遺伝子導入細胞に、細胞表面のFasリガンドを可溶性Fasリガンドに変換するタンパク質分解酵素の活性を阻害するインヒビターを作用させる方法としては、例えば、これらの細胞の培養液中にインヒビターを添加して培養を行う方法、これらの細胞を含有する液中にインヒ

ビターを添加してインキュベートする方法、各種剤型に製剤化して生体に投与する方法などが挙げられる。

【0017】Fasリガンド発現細胞またはFasリガンド遺伝子導入細胞の細胞表面のFasリガンドをFasリガンドに対する抗体を用いて検出する方法であって、該細胞に、細胞表面のFasリガンドを可溶性Fasリガンドに変換するタンパク質分解酵素の活性を阻害するインヒビターを作用させてから、Fasリガンドに対する抗体を用いて検出するFasリガンドの検出方法では、抗体として、Fasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体を用いることが好ましい。このようなモノクローナル抗体としては、例えば、工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-5044 (ハイブリドーマNOK1)、FERM BP-5045 (ハイブリドーマNOK2)、FERM BP-5046 (ハイブリドーマNOK3)、FERM BP-5047 (ハイブリドーマNOK4)、及びFERM BP-5048 (ハイブリドーマNOK5)として寄託されている各ハイブリドーマ細胞株から産生される各モノクローナル抗体(NOK1~5)を挙げることができる。

【0018】

【実施例】以下に実施例を挙げて、本発明についてより具体的に説明する。

【0019】[実施例1] Fasリガンド遺伝子導入細胞の培養上清中の可溶性Fasリガンドの定量

複数の抗Fasリガンド抗体を組み合わせて、可溶性Fasリガンドの定量実験を行った。

hFasL-L5178Yの調製

ヒトFasリガンド遺伝子を下記の方法によりL5178Y細胞に導入して、ヒトFasリガンド-L5178Y細胞を調製した。すなわち、PMK i t Neoに組み込んだヒトFasリガンド遺伝子1 μ gに対し、Xho IとNot I (ベーリンガー製)の制限酵素を各1単位加え、付属緩衝液を添加後、37℃にて2時間反応させた。この液について、1%アガロースゲル電気泳動を行った。UV照射のもとでFasリガンドに相当する約850bpのバンドを切り出した。このアガロースゲルから、GENECLEAN IIキット(BIO101、フナコシ製)を用いて、DNAを抽出した。すなわち、付属のNaI液をゲルに加え、65℃で10分間インキュベートし、ゲルを溶かした後、これにグラスミルク(glass milk)を加え5分間ローテートし、DNAを吸着させた。このグラスミルクをNew-WASH液で3回洗浄後、TE緩衝液10 μ lに懸濁し、65℃で3分間インキュベートすることによりDNAを溶出させた。次に、BCMG S₃₀₀のベクター1 μ gについても同様にXho IとNot Iで制限酵素処理を行い、0.75%アガロースゲル電気泳動を行った後、GENECLEAN IIキットを用いて精製した。

【0020】次に、FasリガンドcDNAとBCMG S₃₀₀ベクターのライゲーションをベクター:cDNA=1:2(モル比)になるように混合し、宝酒造製DNAライゲーションキットを用いて、16℃で16時間反応させて行った。この反応液を、大腸菌コンピテンドセル(東洋紡製)と混合して、氷上で30分間、42℃で40秒間インキュベートすることにより、DNAを大腸菌へ導入した。これに対し、SOC培地を加え、37℃で1時間振盪培養後、アンピシリン入りのLB寒天培地に分注し37℃にて1日間培養した。その後、出現したコロニーをLB培地で37℃1日間培養した後、アルカリ法にて、プラスミド(ヒトFasリガンド-BCMG S₃₀₀)を回収した。このヒトFasリガンド-BCMG S₃₀₀1 μ gについて、L5178Y細胞1 \times 10⁶個に対し、エレクトロポレーション法にて、遺伝子導入を行った。条件は、ジーンパルサー(バイオラッド製)を用い、29.6V、960 μ Fにて実施した。この細胞を、再度10%FCS・RPMI1640培地5mlに懸濁した。6ウェルプレートにこの細胞の液を入れて培養を行ったが、このとき、G418(GIBCO製)を0.4mg/mlになるように培地に添加した。10日の培養後コロニーが得られたので、限界希釈法により細胞をクローニングした。得られたクローンについてノーザンハイブリダイゼーション法によりヒトFasリガンドのmRNAが一番高いものについて選別し、培養した。これをFasリガンド-L5178Y細胞とした。

【0021】可溶性Fasリガンドの調製

ヒトFasリガンド-L5178Y細胞を、無血清培地Excell300™(JRH Biociences製)にて大量に培養した。具体的には、1 \times 10⁶個/mlのFasリガンド-L5178Y細胞を1リットルのカルチャーバック(セキスイ製)30個を用い、合計30リットル培養した。培養は5日間行い、その後1,000g、15分間の遠心分離により培養上清を回収した後、Minita-n™(ミリポア製)を用いて300mlに濃縮した。この濃縮したFasリガンド-L5178Y培養上清をNOK1-セファロースビーズを用いたカラムにて精製した。精製はカラムをFPLCに接続し、300mlの濃縮培養上清を吸着後、よくカラムを洗浄し、0.1Mのグリシン-塩酸pH3.0にて溶出した。これについてPBSを透析後、一部をSDS-PAGEし、ゲルを銀染色して、単一バンドであることを確認した後、バイオラッドのプロテインアッセイ液で、蛋白質量を測定した。今回の培養により10 μ gの可溶性Fasリガンドを得た。これをスタンダードの可溶性Fasリガンドとした。

【0022】NOK1のビオチン化

ハイブリドーマNOK1が産生したモノクローナル抗体NOK1(NOK1抗体)をビオチンでラベルした。方法は、常法に従い実施した。すなわち、10mg/ml

にPBSで調製したモノクローナル抗体NOK1を0.1Mの炭酸緩衝液pH9.2に透析し、バッファー交換した。この抗体液1mlに対し1mgのNHS-LC-Biotin (ピラス社製)を同炭酸緩衝液1mlに溶かしたものを0.2ml加え、室温で1時間反応させた。これをPBSにて1昼夜透析した。これをビオチン化モノクローナル抗体NOK1として用いることにした。

【0023】サンドイッチELISA (可溶性Fasリガンドの定量)

可溶性Fasリガンドの定量は、以下に述べるサンドイッチELISAのプロトコールにて実施した。サンプルは、可溶性Fasリガンド分子を用いて、スタンダードな標準曲線を作成した。

1) 96ウェルELISAプレート (住友ベークライト製No. MS-8996F) に対し、 $50\mu\text{l}$ /ウェルの割合で、NOK3抗体を (精製抗体を $10\mu\text{g}/\text{ml}$ をPBSで希釈したもの) 加えた。このプレートについて、 4°C で16時間放置しモノクローナル抗体NOK3をプレート底面に固定した。なお、 37°C で4時間放置し、モノクローナル抗体NOK3をプレート底面に固定してもよい。

2) 固定に用いたNOK3の溶液を捨てて、2倍にPBSで希釈したブロックエース (大日本製薬製) を $200\mu\text{l}$ /ウェルで分注して、ブロッキングを行った。この処理は、 37°C で2時間放置することで行った。

3) ブロッキングに用いた液を捨て、可溶性Fasリガンド、遺伝子を導入したヒトFasリガンド-L5178Y細胞の培養上清をそれぞれ $50\mu\text{l}$ /ウェルで分注した。可溶性Fasリガンド液をそれぞれ $7\text{ng}/\text{ml}$ 、 $3.5\text{ng}/\text{ml}$ 、 $1.75\text{ng}/\text{ml}$ 、 $0.875\text{ng}/\text{ml}$ 、及び $0.4325\text{ng}/\text{ml}$ の濃度に合わせ、各 $50\mu\text{l}$ /ウェルずつ分注した。培養上清は、原液、 $1/2$ 希釈及び $1/4$ 希釈したものを用いた。その後、室温で1時間反応した。

【0024】4) 1時間後、0.05%のツイーン20が入ったPBSでプレートを5回洗浄した後、 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ に5%のマウスの血清を含む0.05%のツイーン20入りPBSで希釈したビオチン化モノクローナル抗体NOK3を $50\mu\text{l}$ /ウェル分注し、さらに、室温で1時間反応させた。

5) 同様に0.05%ツイーン20入りPBSで5回洗浄後、150倍に0.05%ツイーン20入りPBSで希釈したABC Complex液 (ベクター社製) を $50\mu\text{l}$ /ウェル分注し、さらに、室温で1時間反応させた。

6) 0.05%ツイーン20入りPBSで5回洗浄後、 $1\text{mg}/\text{ml}$ のオルトフェニレンジアミン (和光純薬製) 及び0.03%の過酸化水素水 (和光純薬製) が入った0.1Mクエン酸-リン酸ナトリウム (pH5.

0) 緩衝液 $100\mu\text{l}$ /ウェル入れ、室温で約20分間反応させた。

7) その後、 $100\mu\text{l}$ /ウェル 2Nの硫酸を入れて、反応を停止し、 490nm での吸光度値をマイクロプレートリーダー (バイオラット製) にて測定した。その結果、可溶性Fasリガンドを定量することができた。hFasL/L5178Y (ヒトFasリガンド遺伝子を導入したL5178Y細胞) は、可溶性Fasリガンドとして、 $13.5\text{ng}/\text{ml}$ を分泌していることがあきらかとなった。

【0025】[実施例2] 次に、Fasリガンドの可溶性Fasリガンド化による遊離抑制を試みた、具体的には、各種プロテアーゼインヒビターを培養液に加えて、培養を行った。すなわち、24wellマルチプレート (ファルコン製) に、10%FCS-RPMI1640培地にて 1×10^6 個/ ml のhFasL/L5178Yを1ml入れて培養するところに、

BB94 (マトリクスメタロプロテアーゼインヒビター) を $10\mu\text{M}$ 、

20 KB8301 (マトリクスメタロプロテアーゼインヒビター) を $10\mu\text{M}$ 、

アプロチニン (セリンプロテアーゼインヒビター) を $10\mu\text{M}$ 、

ロイペプチン (セリン/システインプロテアーゼインヒビター) を $100\mu\text{M}$ 、

E64 (システインプロテアーゼインヒビター) を $100\mu\text{M}$ 、

ペプスタチン (システインプロテアーゼインヒビター) を $100\mu\text{M}$ 、

30 ベスタチオン (アミノペプチダーゼインヒビター) を $100\mu\text{M}$

になるように、それぞれ3ウェルずつ加えて 37°C で2日間培養した。なお、コントロールとしてインヒビターを加えないものを用いた。

【0026】2日後、培養上清を回収し、前述の方法であるサンドイッチELISAにて上清中の可溶性Fasリガンドの量を測定した。その値について、インヒビターを加えていないところの培養上清中の可溶性Fasリガンドを100としたときの可溶性リガンドの相対的な割合を示すのが図1である。図1中の～は、先のインヒビターの番号に対応している。図1をみて明らかに、マトリクスメタロプロテアーゼインヒビター (BB94及びKB8301) を用いると、可溶性Fasリガンドの量が有意に抑制され、他のプロテアーゼに対するインヒビターには、効果のないことがわかった。すなわち、マトリクスメタロプロテアーゼを阻害する物質を添加することが、Fasリガンドが可溶性Fasリガンドとして遊離するのを抑制する効果的な方法であることが理解できる。

50 【0027】[実施例3] マトリクスメタロプロテアー

ゼインヒビター添加による細胞表面Fasリガンドの増強（フローサイトメーターによる解析）

hFasL/L5178Y細胞について、マトリクスメタロプロテアーゼインヒビター（BB94）の添加培養により、Fasリガンドが細胞表面に蓄積がみられるか否かについて、フローサイトメーターによる解析により検討した。すなわち、hFas/L5178Y細胞は、

（1）BB94を10 μ M入れて2日間培養したものと、（2）未添加で培養したものを、それぞれPBSで1 \times 10⁶個/mlに調製した。チューブ（ファルコンNo. 2008）にこれらの細胞を1 \times 10⁶個ずつ入れた。

【0028】次いで、ハイブリドーマNOK1の培養上清100 μ lを入れ、氷上で30分間反応させた。次に、PBSで遠心洗浄（1500rpm、1分間2回）し、PE-抗マウス1g/s（ファーマンジェン製）1 μ lを加え、さらに氷上で20分間反応させた。反応後、PBSで2回遠心洗浄を行い、PBS200 μ lに懸濁した後、FACScanにて測定した。なお、比較としてヒトFasリガンド遺伝子を入れていないL5178Yのみを用いた。その結果を図2及び図3に示す。図2に示すように、比較用に検討したL5178Y細胞では、マトリクスプロテアーゼインヒビターであるBB94を添加しても、添加しなくてもFACScanの測定結果は変わらない。図2の点線（無添加）と実線（BB94添加）がほぼ重なっている。これに対して、ヒトFasリガンド遺伝子を導入した細胞hFas/L5178Yでは、図3に示すように、BB94の添加により著しい細胞表面Fasリガンドの蓄積が認められた。したがって、本発明の方法は、効率良く細胞表面上のFasリガンドを検出するのに有用である。

【0029】〔実施例4〕ヒト健常人末梢血リンパ球におけるFasリガンドの発現解析

ヒト健常人末梢血リンパ球におけるFasリガンドの発現は、mRNAレベルでは活性化したT細胞で認められるが、他の細胞には認められないとの解析データがある。しかし、タンパク質レベルでの解析では何もなく、本発明の方法によりフローサイトメーターでFasリガンドの発現が解析可能かどうか検討した。検討は、以下の方法で行った。

（1）健常人静脈より末梢血をヘパリン添加シリンジにて10ml採取し、これをPBSで2倍に希釈後、Ficoll-paque（ファルマシア製）を用いた密度勾配遠心分離法にてリンパ球分画（PBMC）を回収した。

（2）回収したリンパ球分画の半分について、10nMのPMAと、500nMのイオノマイシン、及び10 μ MのBB94存在下で、4時間インキュベートして、PBMCのT細胞を活性化させた（37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下）。

【0030】（3）細胞を回収後、2カラーのフローサイトメーター解析を行った。すなわち、活性化したものと、活性化していないものそれぞれをPBSで1 \times 10⁶個/mlに調製し、それぞれチューブ（ファルコンNo. 2008）6本ずつに1mlずつ分注した。次いで、抗体を添加した。抗体は、以下のように入れた。

1及び7：PE標識したNOK1抗体のみ

2及び8：PE標識したNOK1抗体+FITC-抗CD4抗体（ファーマンジェン製）1ml

10 3及び9：PE標識したNOK1抗体+FITC-抗CD8抗体（ファーマンジェン製）1ml

4及び10：PE標識したNOK1抗体+FITC-抗CD16抗体（ファーマンジェン製）1ml

5及び11：PE標識したNOK1抗体+FITC-抗CD19抗体（ファーマンジェン製）1ml

6及び12：PE標識したNOK1抗体+FITC-抗CD20抗体（ファーマンジェン製）1ml

なお、1～6は、未刺激のPBMCを用い、7～12

は、活性化させたPBMCを用いた。これらの抗体を入れた後、氷上で30分反応させた。次いで、PBSで遠心洗浄（1,500rpm、1分間、2回）し、PBS100 μ lに懸濁した後ビオチン化抗PE抗体を1 μ l入れて、さらに氷上で30分反応させた。

【0031】（4）PBSで2回遠心洗浄を行った後、PE-アビジンを1 μ l入れ、さらに氷上で30分反応させた。反応後PBSで洗浄を行い、PBS200 μ lに懸濁した後、FACScanにて2カラー解析を行った。FACScan解析では、まず、FL1側のFITCの蛍光について陽性細胞のみを選別し、その部分の細胞について、FL2側のFasリガンドの発現をみた。

その結果を図4～15に示す。これらの図中の、

・ ・ ・ は、上記抗体の入れ方の番号と対応する。これらの図から明らかなように、未刺激である健常人末梢血リンパ球は、Fasリガンドを発現していないが（図4～9）、活性化させるとCD4陽性T細胞（図11）、及びCD8陽性T細胞（図12）にFasリガンドの発現が認められた。すなわち、本発明の方法は、フローサイトメーター解析が可能であることが実証された。

【0032】

40 【発明の効果】本発明によれば、フローサイトメーター解析がヒトのリンパ球でも可能になった。このことは、診断において各種疾患の患者のリンパ球から直接Fasリガンドの発現を解析することができ、診断に有用となることを意味している。また、前述のように、血液中や体液中にFasリガンドがもれないようになるため、正常組織を傷つけないという治療用のメリットもある。

【図面の簡単な説明】

【図1】サンドイッチELISA法による可溶性Fasリガンド量の測定結果を示すグラフである。

50 【図2】FACScanによる細胞表面のFasリガン

ドの増強の有無の解析結果を示す図である。

【図3】FACSscanによる細胞表面のFasリガンドの増強の有無の解析結果を示す図である。

【図4】ヒト末梢決リンパ球のFasリガンドの発現をフローサイトメトリーで解析した図である。

【図5】ヒト末梢決リンパ球のFasリガンドの発現をフローサイトメトリーで解析した図である。

【図6】ヒト末梢決リンパ球のFasリガンドの発現をフローサイトメトリーで解析した図である。

【図7】ヒト末梢決リンパ球のFasリガンドの発現をフローサイトメトリーで解析した図である。

【図8】ヒト末梢決リンパ球のFasリガンドの発現をフローサイトメトリーで解析した図である。

【図9】ヒト末梢決リンパ球のFasリガンドの発現を *

*フローサイトメトリーで解析した図である。

【図10】ヒト末梢決リンパ球のFasリガンドの発現をフローサイトメトリーで解析した図である。

【図11】ヒト末梢決リンパ球のFasリガンドの発現をフローサイトメトリーで解析した図である。

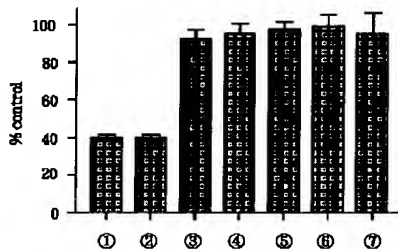
【図12】ヒト末梢決リンパ球のFasリガンドの発現をフローサイトメトリーで解析した図である。

【図13】ヒト末梢決リンパ球のFasリガンドの発現をフローサイトメトリーで解析した図である。

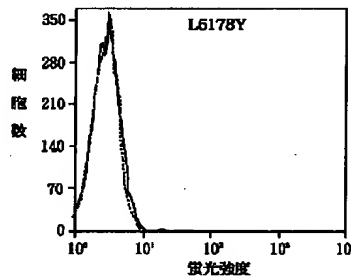
【図14】ヒト末梢決リンパ球のFasリガンドの発現をフローサイトメトリーで解析した図である。

【図15】ヒト末梢決リンパ球のFasリガンドの発現をフローサイトメトリーで解析した図である。

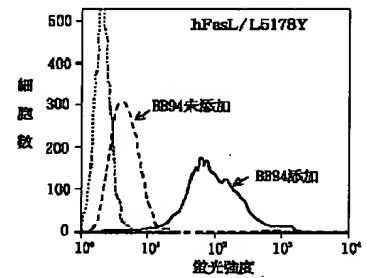
【図1】



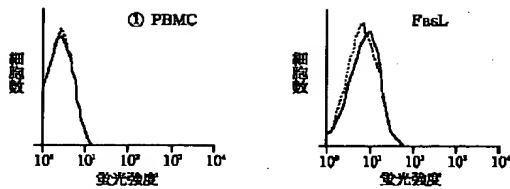
【図2】



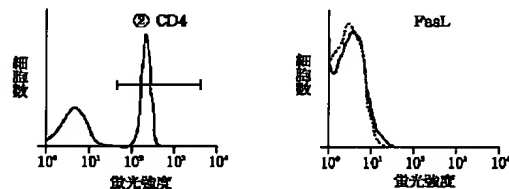
【図3】



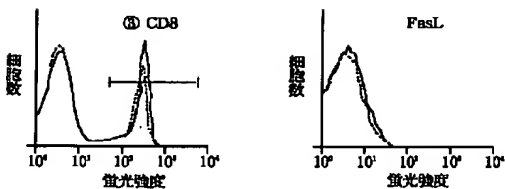
【図4】



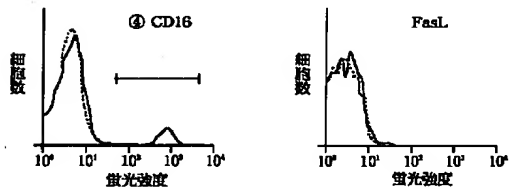
【図5】



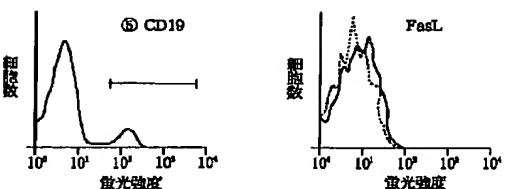
【図6】



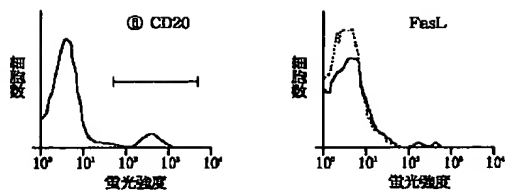
【図7】



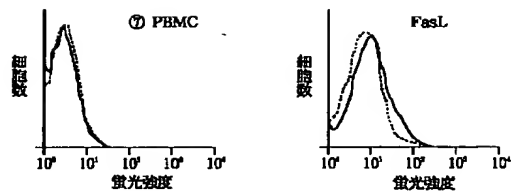
【図8】



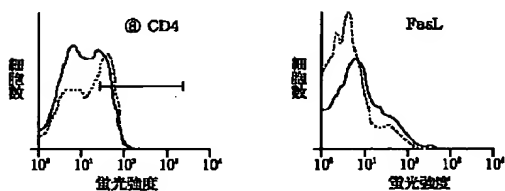
【図9】



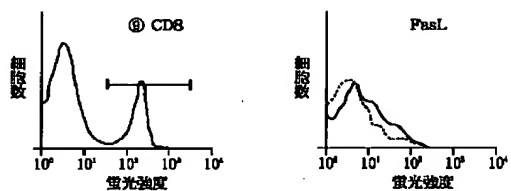
【図10】



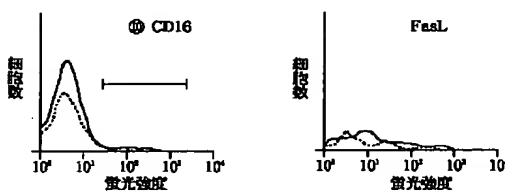
【図11】



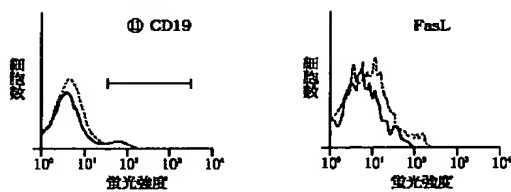
【図12】



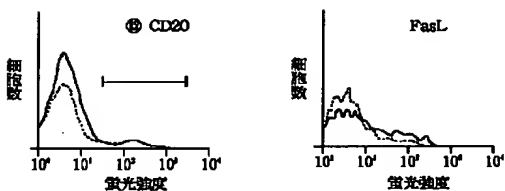
【図13】



【図14】



【図15】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 0 7 C 311/29
C 0 7 D 333/34
C 0 7 K 14/705
C 1 2 N 9/99
C 1 2 P 21/08
G 0 1 N 33/566

C 0 7 D 333/34
C 0 7 K 14/705
C 1 2 N 9/99
C 1 2 P 21/08
G 0 1 N 33/566
A 6 1 K 37/02

(72) 発明者 奥村 康

東京都文京区本郷2-1-1 順天堂大学
医学部免疫学講座内

(72) 発明者 中田 元巳

神奈川県横浜市栄区田谷町1番地 住友電
気工業株式会社横浜製作所内